



УДК 577.175.324.012.7

**СТАТИСТИЧЕСКИЕ ВЕСА КОНФОРМЕРОВ МОЛЕКУЛЫ  
ТИРОЛИБЕРИНА И УСРЕДНЕНИЕ ЕЕ РАСЧЕТНЫХ  
СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК***Бетиньш Я. Р., Никифорович Г. В.**Институт органического синтеза Академии наук Латвии ССР, Рига*

Для молекулы тиролиберина методом Монте-Карло генерирован статистический ансамбль конформаций и вычислены усредненные значения вицинальных констант спин-спинового взаимодействия в остове и боковой цепи остатка His, процентного содержания *cis*-конформации остатка Pro, а также величин, характеризующих наличие внутримолекулярных водородных связей. Вычисленные средние значения достаточно хорошо соответствуют экспериментально наблюдаемым. Это дает основание предполагать, что генерированный статистический ансамбль близок к реально существующему и что нет какой-то одной уникальной структуры тиролиберина в растворе.

Экспериментальные исследования пространственной структуры олигопептидов в растворе проводятся в настоящее время чрезвычайно широко. Подавляющее большинство работ подобного рода допускает, однако, существенный пробел в интерпретации полученных результатов: предполагается, что все измеренные значения экспериментальных характеристик относятся к одной и той же уникальной структуре молекулы олигопептида. Между тем очевидно, что измеряемые значения — результат усреднения по набору конформеров молекулы, обладающих в растворе сравнимой стабильностью. Следовательно, для корректной интерпретации данных физико-химического эксперимента необходимы сведения о полном наборе стабильных структур рассматриваемого олигопептида, включая сведения о величинах статистических весов каждого конформера, полученные независимым способом.

Источником сведений подобного рода в настоящее время может служить лишь полуэмпирический конформационный анализ, с помощью которого удастся выделить и подробно описать полные наборы низкоэнергетических структур остова сравнительно небольших олигопептидов (см., например, [1]). Однако из-за погрешностей, присущих упомянутым расчетным методам, — в первую очередь из-за неучета энтропийного вклада в величину свободной энергии и неучета влияния растворителя, — вычисляемые величины статистических весов отдельных конформеров оказываются заведомо неверными. Выход из положения (по крайней мере частичный) можно искать в применении статистических методов типа метода Монте-Карло, позволяющих осуществить расчет величин свободной энергии конформеров. При этом расчет величин свободных энергий конформеров монопептидов, как показано в работе [2], приводит к лучшему воспроизведению экспериментальных данных, чем учет влияния растворителя, проведенный в работе [3] для тех же монопептидов.

Сама по себе идея использования метода Монте-Карло для воспроизведения значений экспериментальных характеристик, усредненных по конформерам олигопептида, неоригинальна: в работе [4], например, с помощью этого метода исследовались молекулы ангиотензина и энкефалина. Однако вычислительный алгоритм, использованный в работе [4] (генерирование конформаций во всем объеме пространства углов внутреннего вращения, разделенного на дискретные ячейки с шагом  $30^\circ$ ), предполагает большой расход машинного времени, поскольку для получения корректных результатов при таком подходе требуется генерирование очень представительного ансамбля конформаций (это условие явно не выполне-

но в работе [4]). Мы предлагаем генерировать канонический ансамбль конформаций лишь в окрестностях (достаточно больших) заранее найденных низкоэнергетических локальных минимумов пептидного остова данной молекулы. При этом возникает проблема расчета величин статистических весов для каждого из таких минимумов, для решения которой можно воспользоваться следующим приемом. В рассматриваемой области конформационного пространства  $G$  выбирается небольшая подобласть  $G'$ , такая, чтобы она содержала достаточно много генерированных конформаций и чтобы по ней можно было бы вычислить интеграл вида  $I = \int_{G'} \exp[U(\varphi)/RT] d\varphi$ , где  $\varphi$  — набор углов внутреннего вращения, харак-

теризующий конформацию, а  $U(\varphi)$  — ее потенциальная энергия. Тогда, если  $N'$  — количество конформаций, попавших в подобласть  $G'$ , а  $N$  — такая же величина для  $G$ , то соотношение  $N'/N$  можно использовать в качестве оценки величины  $I/Z$ , где  $Z = \int_G \exp[U(\varphi)/RT] d\varphi$  — статистический интеграл рассматриваемой области  $G$ . Следовательно, искомая величина  $Z$  оценивается как

$$Z \approx IN/N'. \quad (1)$$

Отметим, что размер подобласти  $G'$  в каждом отдельном случае выбирается так, чтобы величина  $N'/N$  была статистически достоверной и в то же время вычисление интеграла  $I$  обеспечивалось с достаточной точностью.

В настоящей работе в качестве примера рассматриваются результаты, относящиеся к тиротропин-релизинг-фактору (TRF, тиролиберин) — природному пептиду с последовательностью <Glu-His-Pro, регулиющему секрецию тироидного гормона гипофизом. Это соединение неоднократно исследовалось методами физико-химического эксперимента и теоретического конформационного анализа, причем для его пространственной структуры в растворе предлагались самые различные варианты (обзор см. в монографии [1], гл. 2.5). Можно констатировать, что из всей совокупности экспериментальных данных по тиролиберину в структурных терминах наиболее четко могут быть интерпретированы: 1) величины вицинальных констант спин-спинового взаимодействия  $J_{\alpha\text{H}-\text{NH}}$  и  $J_{\alpha\text{H}-\text{C}\beta\text{H}}$  (см. [5] и [6]) для остатка His, 2) величина процентного содержания *цис*-конформации остатка Pro [7] и 3) данные о наличии либо отсутствии внутримолекулярных водородных связей (обзор см. [1]). В литературе описано несколько вариантов зависимостей, связывающих величину  $J$  со значениями соответствующего угла внутреннего вращения: наиболее предпочтительными для зависимостей  $J_{\alpha\text{H}-\text{NH}}(\varphi)$  и  $J_{\alpha\text{H}-\text{C}\beta\text{H}}(\chi_1)$  представляются кривые, предложенные в работах [8, 9] и [10, 11] соответственно.

Таблица 1

Тип и характеристики локальных минимумов молекулы тиролиберина

| Тип структуры | $\Delta U$ ,<br>ккал/моль | <Glu      |           | His       |          |          | - Pro     |
|---------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
|               |                           | $\varphi$ | $\varphi$ | $\varphi$ | $\chi_1$ | $\chi_2$ | $\varphi$ |
| BBB           | 0,00                      | 165       | -150      | 83        | 180      | 54       | 160       |
| BBB           | 0,70                      | 161       | -143      | 165       | -65      | -71      | 158       |
| RBB           | 0,18                      | -37       | -151      | 82        | 180      | 54       | 160       |
| RBB           | 0,65                      | -37       | -142      | 165       | -64      | -70      | 159       |
| BLB           | 0,42                      | 163       | 63        | 82        | -178     | -95      | 160       |
| RLB           | 0,54                      | -37       | 63        | 82        | -178     | -95      | 160       |
| BBB*          | 0,93                      | 160       | -142      | 158       | -65      | 90       | 160       |
| RBB*          | 1,02                      | -38       | -144      | 158       | -67      | 97       | 157       |
| BBR           | 2,48                      | 165       | -150      | 82        | 180      | 56       | -56       |
| BBR           | 3,13                      | 161       | -143      | 165       | -65      | -70      | -56       |
| RBR           | 2,66                      | -37       | -151      | 82        | 180      | 55       | -56       |
| RBR           | 3,08                      | -37       | -143      | 165       | -65      | -69      | -56       |
| RLR           | 2,81                      | -37       | 63        | 82        | 180      | 50       | -56       |

\* Структуры с *цис*-конформацией остатка Pro.

Набор низкоэнергетических локальных минимумов пептидного остова молекулы тиролиберина был получен с помощью методов, описанных в работе [12], при использовании атом-атомных потенциалов и данных о валентной геометрии, предложенных в работах [13] и [14] соответственно (табл. 1). Применение для той же цели потенциалов, описанных в [12], сужает круг рассматриваемых конформаций: «выпавшими» оказываются структуры остова типов *BLB*, *RLB*, а также структуры с *цис*-конформацией остатка Pro (обозначения см. в табл. 1). Следует также отметить, что, хотя влияние растворителя в явном виде в описываемых расчетах не учитывалось, используемые модельные представления (например, нейтральность боковой цепи остатка His) ближе к условиям, существующим в неполярном растворителе типа диметилсульфоксида (DMSO), чем к условиям водной среды.

В результате генерирования конформаций по приведенной выше методике в каждой из низкоэнергетических областей конформационного пространства молекулы тиролиберина был получен статистический набор, состоящий из 10 000 структур. Такое количество точек в данном случае обеспечивает заполнение области в соответствии с каноническим распределением. При генерировании структур молекулы тиролиберина окрестностями локальных минимумов остатков считались следующие интервалы двугранных углов: для *B*- и *R*-конформации остатка  $\langle \text{Glu} \rangle \varphi 60-240$  и  $-120-30^\circ$  соответственно; для *B*- и *L*-конформации остатка His  $\varphi -190-0$ ,  $\psi 0-200^\circ$  и  $\varphi 0-120$ ,  $\psi -20-190^\circ$ ; для *B*- и *R*-конформации остатка Pro  $\varphi 60-240$  и  $-120-30^\circ$ , а значения углов боковой цепи остатка His не ограничивались.

Таблица 2  
Статистические веса ( $Q$ ), минимальные потенциальные ( $\Delta U$ ) и свободные ( $F$ ) энергии структур статистического ансамбля

| Тип структуры | $Q$    | $\Delta U$ | $F = -kT \ln Q - F_0$ |
|---------------|--------|------------|-----------------------|
| <i>BBB</i>    | 0,5113 | 0,00       | 0,00                  |
| <i>RBB</i>    | 0,2238 | 0,18       | 1,39                  |
| <i>BLB</i>    | 0,1080 | 0,42       | 2,61                  |
| <i>RLB</i>    | 0,0646 | 0,54       | 3,47                  |
| <i>BBB</i> *  | 0,0567 | 0,93       | 3,69                  |
| <i>RBB</i> *  | 0,0272 | 1,02       | 4,92                  |

\* Структуры с *цис*-конформацией остатка Pro.

Таблица 3  
Теоретические, экспериментальные и расчетные среднестатистические значения вицинальных констант остатка His в низкоэнергетических структурах молекулы тиролиберина

| Тип структуры                  | Теоретические значения констант |     |                                |      |                                |      |
|--------------------------------|---------------------------------|-----|--------------------------------|------|--------------------------------|------|
|                                | $J_{C^{\alpha}H-NH}$            |     | $J^1_{C^{\alpha}H-C^{\beta}H}$ |      | $J^2_{C^{\alpha}H-C^{\beta}H}$ |      |
|                                | [8]                             | [9] | [10]                           | [11] | [10]                           | [11] |
| <i>BBB</i>                     | 8,3                             | 7,2 | 7,3                            | 8,1  | 6,4                            | 7,1  |
| <i>RBB</i>                     | 7,8                             | 6,9 | 8,4                            | 9,4  | 3,2                            | 3,5  |
| <i>BLB</i>                     | 8,3                             | 6,2 | 11,9                           | 13,4 | 3,3                            | 3,5  |
| <i>RLB</i>                     | 8,2                             | 6,2 | 11,4                           | 12,9 | 3,4                            | 3,7  |
| <i>BBB</i> **                  | 8,7                             | 7,5 | 3,8                            | 4,1  | 9,6                            | 10,8 |
| <i>RBB</i> **                  | 7,6                             | 6,8 | 3,4                            | 3,6  | 11,9                           | 13,4 |
| Среднестатистическое значение  | 8,2                             | 6,9 | 8,0                            | 8,8  | 5,5                            | 6,0  |
| Измеренное в работах [5] и [6] | 8,2*                            | 7,5 | 7,6                            | 7,6  | 5,3                            | 5,3  |

\* Скорректировано согласно работе [8].

\*\* Структуры с *цис*-конформацией остатка Pro.

Рис. 1. Плотность распределения ( $\rho$ ) расстояний ( $R$ ) между предполагаемыми донорами и акцепторами водородной связи:  $a$  —  $\text{CO}_{\text{Pro}} \dots \text{N}^{\text{H}}_{\text{His}}$ ;  $b$  —  $\text{CO}_{\text{His}} \dots \text{NH}_2(\text{Pro})$ ;  $c$  —  $\text{CO}_{<\text{Glu}} \dots \text{NH}_2(\text{Pro})$

Рис. 2. Плотность распределения ( $\rho$ ) значений углов (град.) внутреннего вращения:  $a$  —  $\psi_{<\text{Glu}}$ ;  $b$  —  $\psi_{\text{His}}$ ;  $c$  —  $\psi_{\text{His}}$ ;  $d$  —  $\psi_{\text{Pro}}$

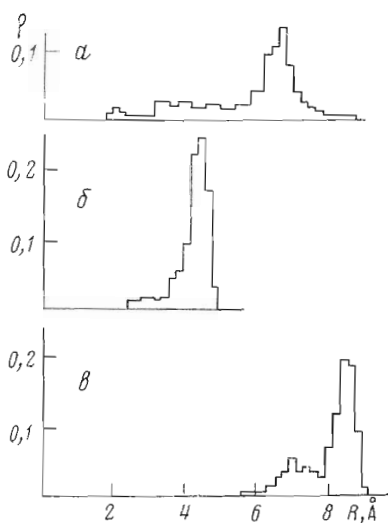


Рис. 1

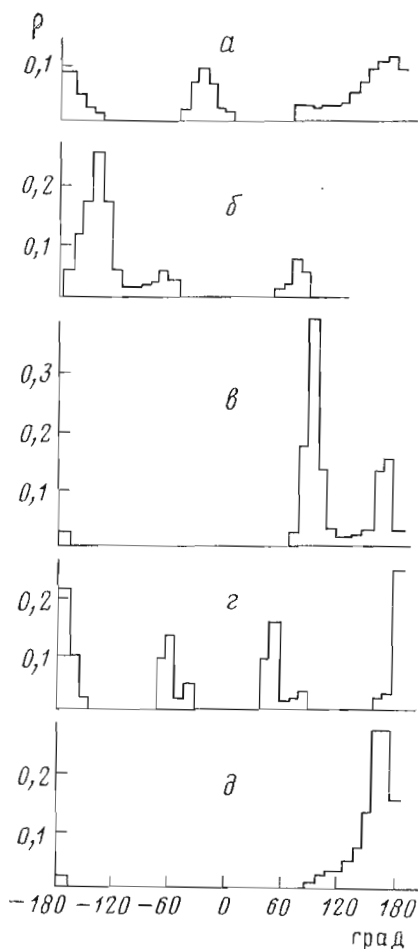


Рис. 2

Во всех расчетах по статистическому ансамблю в качестве подобласти  $G'$  использовался гиперкуб по углам внутреннего вращения остова с центром в точке локального минимума и ребром  $40^\circ$ . Интеграл  $I$  в выражении для статистического веса данной области  $G$  вычислялся по формуле Хаммера и Струда, приведенной в работе [15], где в качестве подинтегральной функции в каждом узле вычислялся интеграл (по формуле Гаусса) по углу  $\chi_1$  остатка His (угол  $\chi_2$  фиксировался в положении минимума). В табл. 2 приведены термодинамические характеристики для шести областей, обладающих наибольшими статистическими весами (больше 1%). На основании полученного ансамбля конформаций вычислялись средние значения различных структурных характеристик; их соответствие экспериментально измеряемым величинам обсуждается ниже.

Вицинальные константы  $J_{\text{CH-NH}}$  и  $J_{\text{CH-CNH}}$ , измеренные для тиролиберина в растворе DMSO, сопоставляются со средними значениями этих величин, полученными расчетом (табл. 3). Видно хорошее согласие между расчетными и экспериментальными значениями вицинальных констант; при этом усреднение по структурам из любой отдельно взятой области конформационного пространства (табл. 2) дает значительно худшее совпадение с экспериментом.

Процентное содержание цис-конформации остатка Pro оценивается экспериментально как 14 в водном растворе [5], 7–8 в растворе DMSO [7] с уменьшением этой величины практически до нулевой в растворе пиридина [7]. Как видно из табл. 2, расчетный статистический ансамбль

конформаций тиролиберина содержит около 8% структур с *цис*-изомером остатка Pro, что соответствует экспериментальным данным по DMSO.

*Внутримолекулярные водородные связи* различных типов в молекуле тиролиберина ( $\text{CO}_{\text{Pro}} \dots \text{N}^{\text{H}}\text{His}$ ,  $\text{CO}_{<\text{Glu}} \dots \text{NH}_2(\text{Pro})$ ,  $\text{CO}_{\text{His}} \dots \text{NH}_2(\text{Pro})$ ), предполагаемые по результатам спектроскопических исследований, не получили до сих пор достаточного экспериментального подтверждения (обзор соответствующих работ см. в [1]). В этом отношении показательна работа [16], в которой на основании данных рентгеноструктурного анализа утверждается наличие водородной связи типа  $\text{CO}_{\text{Pro}} \dots \text{N}^{\text{H}}\text{His}$ . Между тем подсчет соответствующего расстояния  $\text{O} \dots \text{N}$  при значениях двугранных углов тиролиберина, приведенных в работе [16] (с валентной геометрией [14]), дает величину 4,0 Å, что заведомо больше расстояния  $\sim 2,8$  Å, характерного для водородных связей рассматриваемого типа. На рис. 1 приведены гистограммы распределений значений расстояний  $\text{O} \dots \text{N}$  в рассчитанном ансамбле конформаций тиролиберина для водородных связей, указанных выше. Видно, что лишь в случае связи  $\text{CO}_{\text{Pro}} \dots \text{N}^{\text{H}}\text{His}$  на гистограмме имеется небольшой пик, указывающий, что в незначительном количестве конформаций ансамбля такая связь может реализоваться. В остальных случаях возможность образования водородных связей, по данным нашего расчета, отсутствует.

*Распределение значений двугранных углов* молекулы по всему ансамблю рассчитанных структур, которые также представляют определенный интерес, показано на гистограммах рис. 2. Лишь внутреннее вращение по углу  $\psi_{\text{P}_{\text{Glu}}}$  можно считать независимым; значения остальных углов оказываются сильно коррелированными, особенно углы  $\chi_1$  и  $\phi$ ,  $\psi$  остатка His.

С помощью вычисленных по ансамблю расчетных структур средних значений физико-химических характеристик молекулы тиролиберина можно воспроизвести измеряемые значения не хуже, чем при использовании любой из структур тиролиберина, предлагаемых другими авторами (сводку подобных структур см. в табл. 26 монографии [1]). Это позволяет полагать, что статистический набор структур молекулы тиролиберина, полученный и описанный в настоящей работе, достаточно близок к реально существующему в растворе, несмотря на отсутствие в наших расчетах учета влияния растворителя.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983, с. 192.
2. Бегиньш Я. Р., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В. Материалы VI симпозиума по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул. Вильнюс, 1982, с. 201.
3. Nemethy G., Hodes Z. I., Scheraga H. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5760–5764.
4. Premilat S., Maigret B. J. Phys. Chem., 1980, v. 84, № 2, p. 293–299.
5. Montagut M., Lemanceau B., Bellocq A. M. Biopolymers, 1974, v. 13, № 12, p. 2615–2629.
6. Donzel B., River J., Goodman M. Biopolymers, 1974, v. 13, № 12, p. 2631–2647.
7. Deslauriers R., Garrigou-Lagrange C., Bellocq A. M., Smith I. C. P. FEBS Lett., 1973, v. 31, № 1, p. 59.
8. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. Tetrahedron, 1973, v. 29, № 6, p. 873–879.
9. DeMarco A., Llinas M., Wütrich K. Biopolymers, 1978, v. 17, № 4, p. 637–650.
10. Kopple K. D., Willey G. R., Tauke R. Biopolymers, 1973, v. 12, № 4, p. 627–636.
11. Cung M. T., Marraud M. Biopolymers, 1982, v. 21, № 5, p. 953–967.
12. Nikiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I. Int. J. Peptide and Protein Res., 1979, v. 13, p. 363–373.
13. Momany F. A., Carruthers L. M., McGuire R. F., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1974, v. 78, № 16, p. 1595–1620.
14. Momany F. A., McGuire R. F., Burges A. W., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1974, v. 79, № 22, p. 2361–2381.
15. Крылов В. И. Приближенное вычисление интегралов. М.: Наука, 1967, с. 500.
16. Kamiya K., Takamoto M., Fujino M., Nishikawa M. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1980, № 10, p. 438–439.

Поступила в редакцию  
9.1.1984

STATISTICAL WEIGHTS OF THYROLIBERIN CONFORMERS AND AVERAGING  
OF CALCULATED STRUCTURE CHARACTERISTICS OF THE MOLECULE

BETINSH J. R., NIKIFOROVICH G. V.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga*

A statistical ensemble of thyroliberin conformations has been generated using Monte-Carlo techniques. The averaged vicinal coupling constants for the peptide backbone and His side chain, percentage of prolyl *cis*-isomers and characteristics of possible intramolecular hydrogen bonds have been calculated. The obtained mean values are in good agreement with the experimental results. This fact indicates that the generated statistical ensemble is similar to the true one and evidences against the existence in solution of a single unique structure of thyroliberin.